

University of Groningen

## Intestinal host-microbe interactions and sex

Elderman, Marlies-Eva

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

### *Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

### *Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

### *Citation for published version (APA):*

Elderman, M-E. (2016). *Intestinal host-microbe interactions and sex*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# Appendix A

**Summary**

In many research fields, men and women are often treated in the same way, while they do show differences in the pathogenesis of several diseases, including intestinal diseases such as inflammatory bowel disease (IBD). Our gut microbiota plays a major role in health and disease and is in close contact with our intestinal immune system. As sex biases in intestinal diseases have been demonstrated, this suggests the existence of sex differences in both microbiota composition and immune responses. Insight into sex specific intestinal immune responses would contribute to the development of more effective and sex specific treatments for intestinal related disorders. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the effect of sex on the intestinal immune system and microbiota composition. Additionally we determined the effect of genetic background, age and reproductive condition, as these factors may interfere with the potential sex effects. In most of our studies we used two mouse strains (C57B1/6OlaHsd (B6) and Balb/cOlaHsd (BALB/c)) with different genetic backgrounds and confirmed differences in intestinal immunity and microbiota. The effect of age was tested using young (3 months) and old (19 months) mice and in ovariectomized (ovx) mice (ovx at the age of 15 months) as a model for menopause. The effect of the reproductive condition was tested using pregnant mice.

Although it has been known since long that peripheral immune responses are different between males and females, it is unknown whether intestinal immune responses differ between males and females. In **chapter 2**, we investigated the effect of sex on several intestinal immune cells (T cells, dendritic cells (DCs), macrophages and natural killer cells (NK) cells) in the Peyer's Patches (PP). For comparison, we also looked at these cells in the spleen, which is representative for the periphery. The PP was chosen as this is the primary immune sampling site in the small intestine. This study demonstrated that, like the well-known sex differences in the peripheral immune system, sex differences do exist in the intestinal immune system, however, in both tissues in a mouse strain dependent manner. The innate immune arm (DCs, macrophages and NK cells) of the PP appeared to be enhanced in male versus female mice (as judged by the percentage of cells and their activation status). On the other hand, the adaptive immune arm, seemed to be reduced in the PP of males, since they had a lower percentage of T cells, although the Th1 cells within this population was higher than females. For several immune populations, such as Tregs and CD103 DCs, we found an interaction between sex and mouse strain; the magnitude of the sex difference was dependent on the mouse strain. Sex hormones are thought to underlie the peripheral immune differences between men and women, and

this may also account for the intestinal immune differences we found in this thesis. This suggestion may be in line with the data in **chapter 4 and 5** where we showed changes in intestinal immune responses and microbiota composition in pregnant (high levels of sex hormones) compared with non-pregnant mice and in ovx (low levels of sex hormones) compared with non-ovx mice. However, since intestinal microbes are able to modulate immune responses, it is tempting to speculate that microbiota composition also plays a role in the peripheral and intestinal immune differences between males and females.

To further study the relationship between intestinal immune responses and microbiota in males and females, in **chapter 3** we analyzed their microbiota composition, mRNA expression in intestinal tissues and immune cell populations in mesenteric lymph nodes (MLNs). Additionally, we correlated transcriptomics and microbiota data to identify bacterial species responsible for sex-specific differences in intestinal immunity. Indeed we found that male and female mice had different intestinal microbiota species, diversity and richness. However, the nature of the sex effects appeared to be determined by the mouse strain, since different bacterial species were enriched in males and females of the two strains. For example, *Lactobacillus plantarum* and *Parabacteroides distasonis* seemed to be enriched in B6 females, while BALB/c females seemed to have an increased abundance of *Turicibacter* and *Clostridium leptum*. The strain dependent sex effects were also observed in the expression of immunological genes in the ileum and the colon. Interestingly, several bacteria enriched in B6 females correlated positively with genes involved in humoral and cell-mediated immune responses, while bacteria enriched in BALB/c males showed the opposite correlation. These results suggest strain specific strategies to induce sex specific differences in immune responses. The net result was the same, since both mouse strains showed similar sex induced differences in immune cell populations in the mesenteric lymph nodes.

In **chapter 4**, we studied the effect of pregnancy on intestinal immune responses. Pregnancy is associated with changes in peripheral immune responses in order to tolerate the semi-allogeneic fetus. The increased levels of estrogens and progesterone during pregnancy are suggested to play a role in these immunological changes. One of the most important changes during pregnancy are the increased number of peripheral regulatory T (Treg) cells. Although this is suggested to be under the influence of estrogen and progesterone, also bacterial species in the intestinal microbiome can induce the generation of Tregs. Therefore, we hypothesized that the intestinal

microbiota is altered during pregnancy in favor of species associated with upregulation of Tregs. In accordance with previous studies, we found that pregnant mice had a higher percentage of Treg cells in their spleen than non-pregnant mice. Beside enhanced Tregs in pregnancy we found intestinal immunological pathways specific for Treg induction or function, such as IL-10 signaling and antigen presentation pathways, which were differentially regulated by pregnancy. In line with our hypothesis, we found that pregnancy influenced intestinal microbiota diversity, richness and composition, however, in a strain dependent way. During pregnancy, BALB/c mice seemed to increase bacteria species, such as *Lactobacillus paracasei et rel.*, *Roseburia intestinalis et rel.* and *Eubacterium hallii et rel.*, which are associated with Treg development and anti-inflammatory responses, while B6 mice hardly changed their microbiota species during pregnancy. This may be due to the fact that B6 mice already had bacterial species (such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus et rel.* and *Lactobacillus plantarum*) which are involved in Treg development and have anti-inflammatory properties, and therefore they may not need to change their microbiome during pregnancy. Our data suggest that microbiota associated with anti-inflammatory and tolerance-inducing properties need to be present during pregnancy and that several strategies of microbiota changes may lead to the same immunological outcome.

Generally, with ageing there is a functional change of the peripheral immune system called ‘immunosenescence’. We hypothesized that the sex differences in the intestinal immune system and intestinal microbiota composition would also change with age. As the intestinal immune system not only comprise immune cells, but also involves a mucus layer, which covers and protects the intestinal epithelial cells from direct contact with microbes, we also studied the effect of age and sex on mucus integrity (**chapter 5**). We found that the mucus thickness was influenced by age, although in a sex dependent way. Mucus thickness decreased with age and sex differences were only found in old mice. The decline in mucus thickness during ageing was severe enough to induce contact between the epithelium and microbiota. Although old females had a significantly thicker mucus layer than old males, it was still significantly thinner than that of young mice and ineffective in preventing contact of bacteria with the epithelium. The decline in mucus thickness with ageing may be explained by the downregulated of genes involved in mucus biosynthesis pathways. Although mucus thickness was not different between young male and female mice, we found differences in the expression of genes related to mucus production and composition in young males as compared

to young females, suggesting a difference in mucus composition. A difference in mucus composition may relate to the different microbiota composition between young male and female mice. Also the changes in mucus with ageing may be related to a changed microbiome, as we found a higher abundance of certain pathobionts (*Bacteroidetes Vulgatus et rel.* and *uncultured Clostridiales*) and a lower abundance of more “beneficial” strains (such as *Lactobacillus* species and unclassified *Clostridiales type IV* and *XIV*) in aged compared to young mice. The changes in mucus and microbiota in old mice were associated with enhanced activation of the immune system as illustrated by a higher percentage of effector T cells in old mice. Also the sex differences in the microbiome in the young mice, were associated with sex differences in T cell populations in the PP, such as a lower percentage of T cells and a higher percentage of CD4<sup>+</sup> and naïve T cells in males than females. Sex differences in these T cell populations generally remained till old age, suggesting that the sex differences in immune populations induced in young mice are permanent and not affected by changes in the microbiome associated with ageing.

This thesis demonstrated sex differences in intestinal immunity and microbiome, however, these differences were dependent on mouse strain and age. Young healthy male and female mice had different microbiomes and associated intestinal immune responses that may benefit their sex specific needs. It seems likely that sex hormones are involved in these differences, since this is also the case for peripheral immune responses and sex hormones are suggested to influence microbiota composition. Although our studies suggest a relation between the intestinal microbiota and immune system at a young age, the sex differences in microbiota composition disappeared at an old age, while most sex differences intestinal immunity were maintained in old mice. This suggests that immune differences develop at a young age and are permanent, and that the age induced changes in the microbiome have no effect on the intestinal immunity. These findings may contribute to the development of more sex specific treatments for intestinal related disorders.

A

# Appendix B

**Samenvatting**



Het effect van geslacht wordt in veel onderzoeksvelden, maar ook in de geneeskunde ondergewaardeerd, vooral in de immunologie. Als gevolg hiervan worden mannen en vrouwen vaak op dezelfde manier behandeld, terwijl ze toch verschillen tonen in veel ziektebeelden, waaronder darm gerelateerde ziekten zoals inflammatoire darmziekte (IBD). Onze darmbacteriën (microbiota) spelen een belangrijke rol in gezondheid en ziekte en hebben nauw contact met het immuunsysteem van de darmen. De verschillen in uiting van darm gerelateerde ziekten tussen mannen en vrouwen suggereert dat zowel de samenstelling van de microbiota als het immuunsysteem verschilt per geslacht. Inzicht in geslacht specifieke immuunreacties draagt mogelijk bij aan de ontwikkeling van meer effectieve geslacht specifieke behandelingen voor darm gerelateerde ziekten. Doormiddel van muizenstudies hebben we met dit proefschrift de rol van geslacht op het immuunsysteem van de darm en op de samenstelling van microbiota onderzocht. Daarnaast hebben we onderzocht of factoren zoals genetische achtergrond, leeftijd en reproductieve conditie interfereren met de mogelijke geslachtsverschillen. In de meeste studies hebben we gebruik gemaakt van twee muizenstammen (C57B1/6OlaHsd (B6) en Balb/cOlaHsd (BALB/c)) met verschillende genetische achtergronden, darmimmunitet en samenstelling van microbiota. Het effect van leeftijd is onderzocht door jonge (3 maanden oud) en oude (19 maanden oud) muizen te gebruiken en door gebruik te maken van geovariëctomeerd (ovx) muizen (als model voor humane menopauze). Het effect van reproductieve conditie is onderzocht door zwangere muizen te gebruiken.

Hoewel het algemeen bekend is dat mannen en vrouwen verschillen in perifere immuunreacties, is het nog onbekend of deze geslachtsverschillen ook aanwezig zijn in het immuunsysteem van de darmen. In **hoofdstuk 2** hebben we gekeken naar het effect van geslacht op verschillende immuun cellen (T cellen, dendritische cellen (DCs), macrofagen en natural killer cellen (NK) in de Peyerse platen (PP) in de darmen. Ter vergelijking hebben ook naar dezelfde cellen gekeken in de milt, wat een representatief orgaan is voor de periferie. De PP zijn gekozen omdat dit de primaire immuun sampling plek is in de dunne darm. Deze studie liet zien dat, naast de bekende perifere immuun geslachtverschillen, ook in de darm geslachtsverschillen in immuun populaties bestaan, alhoewel in beide organen deze afhankelijk waren van de muizenstam. Het aangeboren immuunsysteem (DCs, macrofagen en NK cellen) in de PP leek versterkt te zijn in mannen vergeleken met vrouwen (beoordeeld door het percentage cellen en hun activatie status). Aan de andere kant leek het verworven immuunsysteem zwakker te zijn in de PP van mannen vergeleken met vrouwen, omdat ze een

lager percentage T cellen hadden, hoewel het percentage Th1 cellen binnen deze populatie wel hoger was dan in vrouwen. In verschillende immuun populaties, waaronder Tregs en CD103 DCs, vonden we interactie tussen geslacht en muizenstam; de grootte van de geslachtverschillen was afhankelijk van de muizenstam. Geslachtshormonen worden verondersteld ten grondslag te liggen aan de perifere immuun verschillen tussen mannen en vrouwen en hetzelfde zou kunnen gelden voor de verschillen in het immuunsysteem van de darmen die we in dit proefschrift laten zien. Deze suggestie zou in overeenstemming kunnen zijn met de resultaten uit **hoofdstuk 4 en 5** waar we laten zien dat immuunreacties en samenstelling van microbiota in de darmen veranderden tijdens zwangerschap (hoge concentratie geslachtshormonen) en in ovx vrouwtjes (lage concentratie geslachtshormonen) vergeleken met niet-ovx vrouwtjes. Aangezien darmbacteriën ook in staat zijn om immuunreacties te beïnvloeden is het verleidelijk om te speculeren dat de samenstelling van microbiota ook een rol speelt in de perifere en darm gerelateerde verschillen in immuunreacties tussen mannen en vrouwen.

Om de relatie tussen het immuunsysteem en de microbiota in de darm van mannen en vrouwen verder te onderzoeken hebben we in **hoofdstuk 3** hun microbiota samenstelling, mRNA expressie in darmweefsel en immuun cel populaties in de mesenterische lymfe knopen (MLNs) geanalyseerd. Daarnaast hebben we de transcriptomics en microbiota data gecorreleerd om bacterie soorten te identificeren die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de geslacht specifieke verschillen in darmimmunitet. Inderdaad vonden we dat mannen en vrouwen verschillenden in samenstelling van microbiota en diversiteit. Echter, de richting van de geslachtseffecten bleek beïnvloed te worden door de muizenstam. *Lactobacillus plantarum* en *Parabacteroides distasonis* leken bijvoorbeeld verrijkt te zijn in B6 vrouwtjes ten opzichte van B6 mannetjes, terwijl *Turicibacter* en *Clostridium leptum* verrijkt leken te zijn in BALB/c vrouwtjes ten opzichte van BALB/c mannetjes. Deze muizenstam afhankelijke geslachteffecten waren ook aanwezig in de expressie van immunologische genen in de ileum en colon. Interessant genoeg bleken bepaalde bacteriën die verrijkt waren in B6 vrouwtjes positief te correleren met genen die betrokken zijn bij de humorale en cel gemedieerde immuunreacties, terwijl bacteriën die verrijkt waren in BALB/c mannetjes de tegenovergestelde correlatie lieten zien. Deze resultaten suggereren dat muizenstam specifieke strategieën zorgen voor geslachtsverschillen in immuunreacties. Het netto resultaat was hetzelfde, aangezien beiden muizenstammen dezelfde geslachtverschillen lieten zien in immuun cel populaties in de MLNs.

In **hoofdstuk 4** hebben we het effect van zwangerschap op het immuunsysteem van de darmen onderzocht. Zwangerschap wordt geassocieerd met veranderingen in perifere immuunreacties om de semi-allogene foetus te tolereren. De verhoogde concentraties oestrogeen en progesteron tijdens de zwangerschap worden verondersteld een rol te spelen in deze immunologische veranderingen. Een van de belangrijkste veranderingen tijdens de zwangerschap is het verhoogd aantal T regulatoire cellen (Tregs) in de periferie. Hoewel wordt gesuggereerd dat oestrogeen en progesteron ten grondslag liggen aan deze veranderingen, zijn darmbacteriën ook in staat om de ontwikkeling van Tregs te induceren. Daarom hebben wij de hypothese opgesteld dat de darm microbiota veranderd tijdens de zwangerschap, ten gunste van bacteriesoorten die geassocieerd worden met de stimulatie van Tregs. Overeenkomstig met andere studies vonden wij inderdaad dat zwangere muizen een verhoogd percentage perifere Tregs hadden vergeleken met niet zwangere muizen. Daarnaast vonden we ook verschillen in regulatie van immunologische pathways in de darmen, betrokken bij Treg inductie of functie zoals IL-10 signalering en antigeen presenteerde pathways, tussen zwangere en niet zwangere vrouwtjes. In overeenstemming met onze hypothese vonden we dat zwangerschap de samenstelling en diversiteit van microbiota beïnvloedde, echter afhankelijk van de muizenstam. Zwangere BALB/c muizen leken bacterie soorten te verrijken, zoals *Lactobacillus paracasei et rel.*, *Roseburia intestinalis et rel.* en *Eubacterium hallii et rel.*, die geassocieerd worden met de ontwikkeling van Tregs en anti-inflammatoire reacties. B6 muizen, daarentegen, veranderden hun microbiota nauwelijks tijdens de zwangerschap. Dit zou kunnen komen doordat in B6 muizen al voor de zwangerschap veel bacterie soorten, zoals *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus et rel.* en *Lactobacillus plantarum*, voorkomen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van Tregs en anti-inflammatoire reacties en daarom hun microbiota niet hoeven aan te passen. Onze data suggereren dat een bepaald microbiota geassocieerd met anti-inflammatoire en tolerantie inducerende eigenschappen aanwezig moeten zijn tijdens de zwangerschap en dat verschillende strategieën van microbiota aanpassingen mogelijk leiden tot dezelfde immunologische uitkomsten.

A

Over het algemeen is er een functionele verandering van het perifere immuunsysteem tijdens veroudering dat 'immunosenescence' wordt genoemd. Wij stelden de hypothese op dat geslachtverschillen in de microbiota en immuun cel samenstelling van de darm veranderen tijdens veroudering. Aangezien het immuunsysteem van de darmen niet alleen immuun cellen maar ook een slijm laag bevat, die het darm epitheel bedekt en beschermd

tegen direct contact met microben, hebben wij onderzocht of deze slijmlaag beïnvloed wordt door leeftijd en geslacht (**hoofdstuk 5**). Wij vonden dat leeftijd de dikte van de slijmlaag beïnvloedde, maar afhankelijk van het geslacht van de muizen. De slijmlaag was dunner in oude muizen en geslachtverschillen waren alleen aanwezig in oude muizen. De slijmlaag in oude muizen was zo dun dat darmbacteriën direct contact hadden met epitheel cellen. Hoewel oude vrouwtjes een significant dikkere slijmlaag dan oude mannetjes hadden, was het nog steeds significant dunner dan jonge muizen en ineffectief in het voorkomen van contact tussen bacteriën en de epitheel cellen. De afname van de dikte van de slijmlaag in oude muizen zou verklaard kunnen worden door de downregulatie van genen betrokken bij de productie van slijm. Hoewel de dikte van de slijmlaag niet verschilde tussen jonge mannen en vrouwen vonden we wel een geslachtverschil in de expressie van genen betrokken bij de productie en samenstelling van slijm in jonge muizen. Dit zou kunnen betekenen dat de samenstelling van de slijmlaag verschilt tussen jongen mannen en vrouwen. Een verschil in de samenstelling van de slijmlaag zou gerelateerd kunnen zijn met de gevonden verschillen in microbiota samenstelling tussen jonge mannen en vrouwen. De afname van de slijmlaag in oude muizen zou in verband kunnen staan met de gevonden veranderingen in samenstelling van microbiota tijdens veroudering aangezien wij in oude muizen een hogere aanwezigheid van verschillende pathobionten (*Bacteroidetes Vulgatus et rel.* en *uncultured Clostridiales*) en een verlaagde aanwezigheid van meer gunstige bacteriën (*Lactobacillus* species en unclassified *Clostridiales* type IV and XIV) vergeleken met jonge muizen. De veranderingen in de slijmlaag en samenstelling van microbiota in oude muizen ging gepaard met een verhoogde activatie van het immuunsysteem, geïllustreerd door een verhoogd percentage effector T cellen vergeleken met jonge muizen. De geslachtverschillen in samenstelling van microbiota in jonge muizen ging gepaard met geslachtsverschillen in T cel populaties in de PP, zoals een lager percentage T cellen en een hoger percentage CD4<sup>+</sup> cellen en naïeve T cellen in mannen dan vrouwen. Deze geslachtsverschillen in T cel populaties bleven over het algemeen aanwezig in oude muizen, wat suggereert dat de geslachtverschillen in immuun populaties die geïnduceerd worden in jonge muizen permanent zijn en niet beïnvloed worden door veranderingen in het microbioom die geassocieerd zijn met leeftijd.

Dit proefschrift laat zien dat er geslachtsverschillen zijn in zowel het immuunsysteem van de darm als ook in de samenstelling van de microbiota, hoewel afhankelijk van de muizenstam en leeftijd. Jonge gezonde mannetjes en vrouwtjes muizen hadden een verschillend microbioom en geassocieerde

darmimmunititeit die mogelijk bijdragen aan hun geslacht specifieke behoeften. Het lijkt voor de hand te liggen dat geslachtshormonen hierin een rol spelen, aangezien dit het geval is voor het perifere immuunsysteem en een rol voor geslachtshormonen in de samenstelling van het microbioom ook is gesuggereerd. Hoewel onze studies erop duiden dat er op jonge leeftijd een relatief sterk verschil is tussen het darmbacteriële en de darmimmunologie, verdwenen de geslachtverschillen in microbiota samenstelling in oude muizen, terwijl de meeste geslachtverschillen in het immuunsysteem van de darm behouden bleven in oude muizen. Dit suggereert dat deze immuun verschillen zich ontwikkelen op een jonge leeftijd en permanent zijn en dat de veranderingen in het microbioom tijdens veroudering geen effect hebben op de darmimmunologie. De bevindingen uit dit proefschrift dragen mogelijk bij aan de ontwikkeling van meer geslacht specifieke behandelingen voor darm gerelateerde ziekten.

# Appendix C

**Dankwoord**

Na vier jaar uitgekeken te hebben naar dit moment ben ik supertrots op het eindresultaat! Dit boekje was natuurlijk nooit zo geworden zonder hulp en steun van mijn collega's, vrienden en familie. Daarom wil ik jullie allemaal heel erg bedanken.

Allereerst wil ik beginnen met het bedanken van mijn begeleiders. Marijke, dank voor de fijne samenwerking en alles wat ik van je geleerd heb. Jouw deur staat altijd open en je had altijd tijd om mij te helpen bij mijn "korte advies vragen". Je hebt mij enorm geholpen om flexibeler te worden in mijn gedachten, al had dat soms wat tijd nodig. Als ik door de bomen het bos niet meer zag, had jij nieuwe ideeën waardoor ik weer gemotiveerd verder kon. Paul, bedankt voor alle hulp tijdens mijn promotie en vooral met de laatste loodjes! Door jouw oog voor structuur en goede kijk op de rode lijn van het verhaal wist jij de data van mijn verschillende studies altijd goed te verbinden. Ook ontzettend bedankt voor de extreem snelle feedback die ik altijd kreeg! Ik verheug me erop dat ik bij jullie met een nieuw project verder kan!

Daarnaast wil ik graag de leden van leescommissie, Prof. B.N. Melgert, Prof. H. Smidt en Prof. I. Joosten bedanken voor het beoordelen van mijn proefschrift.

Graag wil ik ook mijn co-auteurs bedanken. Floor Hugenholtz, Clara Belzer, Mark Boekschoten, Adriaan van Beek, Bruno Sovran, Huub Savekoul, Jan Dekker en Jerry Wells hartelijk dank voor de samenwerking en jullie nuttige input voor de artikelen!

Naast mijn begeleiders wil ik ook de rest van mijn collega's bedanken, door al jullie hulp, adviezen en vooral ook gezelligheid kijk ik terug op een hele fijne tijd. Maaike, ook al was onze samenwerking maar kort, het werken met jou vond ik erg leuk en je hebt mij tijdens mijn inwerking enthousiast gemaakt, voor wat achteraf bleek nog een lange FACS carrière ging worden! Bart, als manusje-van-alles heb je mij niet alleen ontzettend geholpen op het lab (heel veel FACS....) maar je had ook eigenlijk altijd wel een oplossing voor van alles en nog wat. Daarnaast waren onze koffiebesprekingen ook erg gezellig! Floor, wat heb ik een leuke tijd gehad met jou als collega! Je was altijd in om iets leuks te doen en we hebben je uiteindelijk zelfs zover gekregen dat je mee deed met koffieleuten. Nu jij weg bent duurt het koffiedrinken veel minder lang en staat de melkschuimer stilletjes op de plank... Leo, als kamer-oudste had jij altijd wijze raad, ik heb enorm veel aan jou gehad en ben je nog een boel rijksdaalders schuldig! Eelke, met jou ben ik alle dierexperimenten begonnen, wat hebben wij een lange dagen in het CDP, U-lab en vooral achter de LSR-II

doorgebracht. Heel veel succes met de afronding van je PhD. Anne Marijn, je bent maar kort mijn kamergenoot geweest, maar ik vond het erg gezellig en super dat je mij Einaudi hebt aanbevolen, hele fijne schrijf muziek! Sandra en Gea, de laatste jaren van mijn PhD hebben jullie mij enorm geholpen met zowel praktisch werk als denkwerk. Sandra, we begonnen de maandagochtend altijd steevast met jou spannende stap verhalen met als hoogtepunt dat we zelf mee zijn geweest naar een van de beruchte tentfeesten! Met jou naar Hoogkerk fietsen was ook altijd erg gezellig en konden we mooi nog even onze werkdag nabespreken. Gea ik hoop dat we jou straks aan het einde van je PhD net zo kunnen helpen als jij bij ons gedaan hebt! Chengcheng and Alberto, I would also like to thank you for all your support these last few years and a special thanks serving all the tea and hot water! Neha, with you I experienced the best conference ever in Vancouver. Scientifically you are brilliant but I also had so much fun with you, your jokes are hilarious! Floris, bedankt voor alle hulp tijdens de dierexperimenten, vooral met de salmonella studies! Theo, jij ook heel erg bedankt voor al je harde werken tijdens de salmonella studies. Jee wat heb jij een lange dagen gemaakt terwijl ik moest toekijken omdat ik niet in het VMT lab mocht met mijn zwangere buik... Samen met Bart en Simon waren we een goed team en hebben we een hoop lol gehad! Verder wil ik ook graag alle andere collega's van de immune-endocrinologie groep bedanken: Genaro, Tamara, Susana, Christina en Tom. Daarnaast wil ik graag Eva, Peter, Renate en Simon bedanken voor alle hulp bij de experimenten en de gezelligheid tijdens de lange dagen!

Uiteraard wil ik ook graag alle andere medewerkers van de Medische biologie bedanken voor de fijne samenwerking de afgelopen jaren. Met name het FACS-team, Geert, Roelof-Jan en Henk zou ik willen bedanken voor alle hulp en adviezen tijdens de lange FACS dagen. Ook Annet, Susan en Hans zou ik willen bedanken voor alle vragen waarbij ik bij jullie terecht kon en alles wat jullie voor mij geregeld hebben.

Mijn studie maakte deel uit van Top Institute Food and Nutrition (TIFN). Ik zou graag iedereen van projectgroep GH002 willen bedanken voor de fijne samenwerking en alle meetings en projecten die we samen gedaan hebben. Adriaan, wat een lange dagen waren het voor jou tijdens de dierexperimenten hier in Groningen. Toch waren die dagen erg gezellig en hebben we mooie resultaten behaald. Succes met je nieuwe baan in Rotterdam! Bruno, working with you in the CDP was super hilarious, thanks for the great time working together!



Ook alle medewerkers van het CDP (dieren-lab) zou ik heel erg willen bedanken voor alle ondersteuning en hulp tijdens mijn dierexperimenten. Minke bedankt voor het geduld dat je met mij had met alle ingewikkelde muizen bestellingen en voor al het regelwerk! Michel, Annemieke, Andre en Pieter bedankt voor de hulp bij de ovariëctomie van mijn muizen. Maurice, Sander, Ar en Natascha ook jullie heel erg bedankt voor alle ondersteuning met de verzorging van de muizen en voor alle gezelligheid ook! Andrea, jij hebt mij enorm geholpen met de verzorging van de muizen. Je hebt ontzettend veel werk verricht met de oude muizen, ik vond onze gesprekken ook altijd erg leuk en ik heb veel van je geleerd over het gedrag van de muizen, bedankt daarvoor! Ook wil ik Arjen erg bedanken voor alle hulp en ondersteuning in het CDP.

Ik wil ook mijn vrienden bedanken voor de interesse in mijn onderzoek, maar vooral ook voor het verdragen van mijn afwezigheid bij feestjes etc... Afgelopen jaren waren redelijk hectisch met het afronden van mijn proefschrift, kleine Teije en ons boerderijtje, maar ik hoop het komende jaren ruimschoots goed te maken en jullie meer aandacht te geven!

Als laatst wil ik mijn lieve familie bedanken voor alle hulp en geduld die jullie mij gegeven hebben de afgelopen jaren. Het was niet altijd even makkelijk voor jullie om met mij om te gaan met al die stress. Pap en mam heel erg bedankt voor al het oppassen, grasmaaien, eten koken, bellen, mijn verhalen aanhoren etc! Lucy en Ari ook erg bedankt voor het inspringen met oppassen met Teije en het lekkere eten dat jullie helemaal uit Arnhem meebrachten! PP & TT enorm bedankt dat jullie er gewoon voor mij zijn, ik hou heel veel van jullie!

# Appendix D

## **Curriculum Vitae**

## Curriculum Vitae

Marlies Elderman was born in Delfzijl, the Netherlands, on the 13th of March 1985. In 2003 she graduated from high school and enrolled at the University of Groningen to study Biology, where she obtained her Bachelor's degree, with the specialization Medical Biology. In 2009, she moved to Wageningen to start the Master Animal Sciences, with the specializations Animal Production Systems and Adaptation Physiology. For her internship, she participated in a transdisciplinary research project in Ghana, to gain more knowledge about collaboration between different disciplines and different cultures. This was a project in collaboration with Expertise Centre Sustainable Development of the University of Amsterdam and Kwame Nkrumah University of Science and Technology in Kumasi, Ghana. She performed her first research project at the Animal Production Systems chair group at Wageningen University under the supervision of Dr. Karen Eilers and Dr. Jessica Milgroom. This project involved assessment of expected changes in livestock farming systems of communities in- and outside the Limpopo National Park in Mozambique after their planned resettlement. For her second research project she investigated the effect of lipopolysaccharide on the activation of the humoral immune response in chicken, supervised by Dr. Aart Lammers. After receiving her Master's degree in 2009, she moved to Welton (United Kingdom) where she worked as a coordinator on a riding school and improved her English. From 2011 till 2012 she worked as junior swine researcher, developing animal nutrition, at Provimi in Velddriel. In 2012 she started as a PhD student at the Immunoendocrinology group at the UMCG in Groningen, supervised by Dr. Marijke Faas, to study the role of sex in host-microbe interactions. Since June 2016 she works as a Postdoc at the same group, studying the immunomodulatory effects of Inulin-type fructans in a Human Papillomavirus vaccination study.

## Publications

- **Elderman, M.**, van Beek, A., Brandsma, E., de Haan, B., Savelkoul, H., de Vos, P., Faas, M. Sex impacts Th1, Treg, and DCs in both the intestinal and systemic immunity in a mouse strain and location dependent manner. *Biology of Sex Differences* 7 (2016)
- **Elderman, M.**, Hugenholtz, F., Belzer, C., Boekschoten, M., van Beek, A., de Haan, B., Savelkoul, H., de Vos, P., Faas, M. Sex and strain dependent differences in intestinal immunity correlates with differences in microbiota diversity. *Submitted*
- **Elderman, M.**, Hugenholtz, F., Belzer, C., Boekschoten, M., de Haan, B., de Vos, P., Faas, M. Pregnancy induced Treg enhancement correlates with differential intestinal transcriptomics expression and specific microbiota composition. *Submitted*
- **Elderman, M.**, Sovran, B., Hugenholtz, F., Graversen, K., Huijskes, M., Houtsma, E., Boekschoten, M., de Vos, P., Dekker, J., Wells, J., Faas, M. Aging induced decline in mucus integrity is associated with changes in microbiota composition, and immunity and is sex dependent. *Submitted*

A

# Appendix E

## **Acknowledgements**

## Acknowledgements

The studies presented in this thesis were performed within the framework of TI Food and Nutrition.

Printing of this thesis was financially supported by:

